

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 352—355, Juli 1969

Zum Normalwert des Coeruloplasmins im Serum und seine Beeinflussung durch Körperarbeit¹⁾

Von G. HARALAMBIE²⁾

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg im Breisgau (Direktoren: Prof. Dr. G. Löhr, Prof. Dr. W. Gerok)

(Eingegangen am 25. Februar 1969)

Der Normalwert des Coeruloplasmins liegt bei männlichen Probanden zwischen 18 und 37 mg/100 ml. Eine einstündige Dauerbelastung hat auf den Coeruloplasminspiegel keinen gesicherten Einfluß. Das Training des Hochleistungssportlers bewirkt eine Erhöhung des Coeruloplasmins im Serum. Es besteht eine gesicherte Korrelation zwischen den Eiweißhexosen, dem Kupfer im Serum und dem Coeruloplasminspiegel.

Normal values for serum ceruloplasmin and the effect of physical exertion

The normal range for serum ceruloplasmin in males is 18—37 mg/100 ml. One hour of physical exertion has no effect on the level of ceruloplasmin, but the serum ceruloplasmin is increased in trained, high performance athletes. There is a correlation between the protein-bound hexoses, the serum copper, and the level of ceruloplasmin.

Bei Sportlern wurde ein erhöhter Serumspiegel der eiweißgebundenen Hexosen (Gesamt-Glykoproteide) im Training gefunden (1—3). Es stellt sich die Frage, in welchem Maße die einzelnen Glykoproteide an dieser Erhöhung mitbeteiligt sind.

In dieser Arbeit wurden Veränderungen des Coeruloplasmins bei körperlichen Belastungen untersucht. Da die in der Fachliteratur angegebenen Normalwerte innerhalb breiter Grenzen schwanken (Tab. 5), was neben biologischen auch methodische Ursachen haben könnte, wurden die meist gebrauchten Bestimmungsmethoden des Coeruloplasmins zunächst geprüft und verglichen.

Arbeitsmethoden und Versuchsgut

Coeruloplasmin wurde im Blutserum nach drei Methoden bestimmt:

1. Kolorimetrische Ermittlung der enzymatischen Aktivität (Oxydation von *p*-Phenylendiamin) (4); Spektralphotometer Zeiss-PMQ II, 540 nm, frische Seren.
2. Einfache radiale Mikro-Immunodiffusion³⁾ (5, 6); Endpipettierung mit einer Hamilton-Mikroliterspritze, Ablesung nach 48 Stdn. mit einer 1/10 mm Lupe. Die Bestimmungen wurden im Serum, das 20 bis 30 Tage bei -30° aufbewahrt wurde, durchgeführt.
3. Chromatographie auf DEAE-Cellulose MN-2100⁴⁾ und spektralphotometrische Ablesung der Coeruloplasmin-Farbe bei 610 nm (7).

Eiweißgebundene Hexosen wurden mit der Tryptophan-Borsäure-Schwefelsäure Reaktion ermittelt (1). Spektralphotometer, 500 nm, 0,5 cm-Küvetten, Standard: Galaktose-Mannose 1:1.

Kupferbestimmungen wurden mit Hilfe des Bathocuproin-Verfahrens durchgeführt⁵⁾.

Es wurden drei Versuchsgruppen untersucht:

1. 18 gesunde Erwachsene (♂, 18 bis 37 Jahre), bei denen die γ -Globuline (Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Streifen, Amido-

schwarzfärbung, Densitometrie) unter 18 rel. % und die Eiweißhexosen unter 130 mg/100 ml lagen.

2. 19 Straßen-Radrennfahrer der deutschen Nationalmannschaft, bei denen die Blutentnahme nach 4 bis 5 Trainings- und Wettkampftagen, morgens, in Ruhe stattfand.

3. 8 sporttreibende Studenten, bei denen Blut unmittelbar vor und 8 bis 10 Min. nach Körperarbeit entnommen wurde. Die Arbeit bestand aus 1 Std. Laufen auf dem Sportplatz (12—14 km, Herzfrequenz telemetrisch registriert 150 bis 170 pro Min.); einige Tage später leisteten die Versuchspersonen 1060—1070 Kpm/Min. am Fahrradergometer für 1 Std. Nach dem Kriterium des Blut-Milchsäurespiegels dürfte die zweite Leistung schwerer als die erste gewesen sein.

Ergebnisse

Kritik der Methoden

Abbildung 1 ist ein Beispiel der linearen Beziehung der Coeruloplasmin-Konzentration (Standard Humanserum, Behringwerke) zum Quadrat des Präzipitat-Durchmessers auf den Diffusionsplatten.

Tabelle 1 zeigt die Reproduzierbarkeit der drei untersuchten Bestimmungsverfahren. Für die radiale Im-

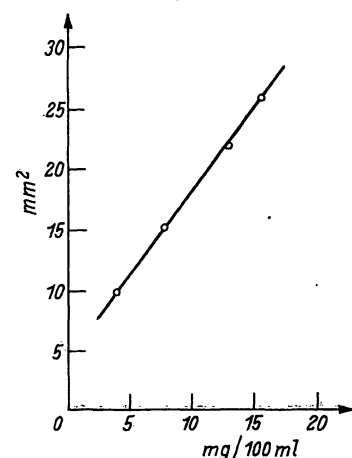


Abb. 1

Beziehung der Durchmesser-Quadrate des Präzipitats zur Coeruloplasminkonzentration (R. I. D.)

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁾ Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung.

³⁾ Partigen-Platten, Behringwerke, Marburg/Lahn.

⁴⁾ Macherey, Nagel & Co., Düren.

⁵⁾ Testpackung der Fa. Hauray, München.

Tab. 1
Reproduzierbarkeit der Coeruloplasmin-Bestimmung in verschiedenen Serumproben

Verfahren	Analyse I	II	III	IV	V	$\bar{x} \pm s$	V [%]
Enzymkinetisch	35,0	34,7	34,6	35,2	34,9	$34,9 \pm 0,24$	0,7
Enzymkinetisch	21,3	20,5	20,9	21,0	21,2	$21,0 \pm 0,31$	1,47
R. I. D.	22,9	22,9	22,8	23,0	—	$22,9 \pm 0,084$	0,37
R. I. D.	25,3	25,2	25,8	25,4	—	$25,4 \pm 0,26$	1,0
Spektrophotometrisch	18,5	17,6	18,2	18,8	18,9	$18,4 \pm 0,525$	2,85

munodiffusion (RID) sind die Werte von verschiedenen Serumverdünnungen (1:4) auf derselben Platte angegeben; Bestimmungen auf verschiedenen Platten ergaben Differenzen unter 1 mg/100 ml.

Der Vergleich zwischen der enzymkinetischen und der RID-Methode ergab gut übereinstimmende Werte (Abb. 2); der Korrelationskoeffizient BRAVAIS-PEARSON

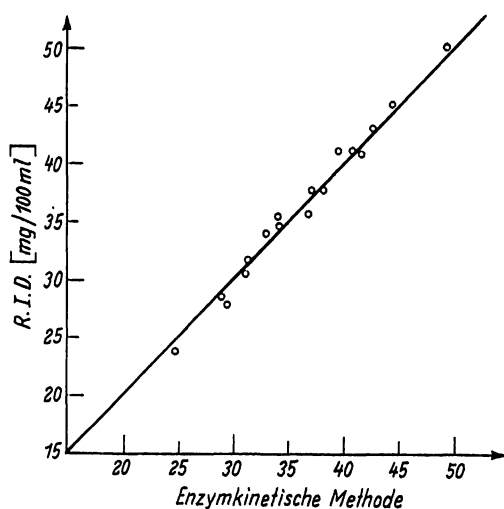


Abb. 2

Vergleich zweier Bestimmungsverfahren für Serum Coeruloplasmin (Radiale Immunodiffusion und enzymkinetische Methode)

beträgt +0,98 und die mittlere quadratische Differenz der beiden Methoden $\pm 0,96$ mg/100 ml.

Tabelle 2 zeigt die Vergleichswerte zwischen der enzymkinetischen, chromatographisch-spektrophotometrischen und der RID-Methode. Alle Werte wurden im dialysierten Serum (18 Std., 0,05M Acetatpuffer, pH 5,5) ermittelt (7). Die eigene Farbe und die enzymatische Aktivität des Coeruloplasmins stehen im

Tab. 2
Vergleich dreier Coeruloplasmin-Bestimmungsverfahren im dialysierten Serum (s. Text). Werte in mg/100 ml

Serum No.	Spektrophotometrisch (7)	Enzymkinetisch (4)	Immunologisch (RID)
1	29,4	30,7	44,5
2	11,7	30,2	44,5
3	14,8	12,1	22,9
4	17,5	15,1	25,8
5	18,3	15,4	25,2
6	15,4	17,4	29,8
7	23,6	17,5	30,2
8	21,8	19,5	34,5
9	23,8	20,0	34,5
		15,2	25,6
		15,4	25,6
		23,5	35,4
		23,2	36,0
		22,5	35,2
		21,8	35,8
		24,0	37,0
		24,3	37,8

dialysierten Serum in guter Übereinstimmung (mittlere quadratische Differenz $\pm 0,70$ mg/100 ml); jedoch sind die durch diese Methoden erzielten Werte 38–40% niedriger als die immunologisch bestimmten.

Normalwerte

Bei 18 ausgewählten gesunden Versuchspersonen war der Coeruloplasmin-Spiegel (RID-Verfahren) im Mittel $27,8 \pm 5,1$ mg/100 ml Serum, Extremwerte von 18 und 37,3 mg/100 ml.

Coeruloplasmin, Glykoproteide und Serumkupfer

Für das gesamte Versuchsgut zeigt sich eine Beziehung des Coeruloplasminspiegels zu den eiweißgebundenen Hexosen, indem Versuchspersonen mit erhöhten Serumglykoproteiden ein ebenfalls erhöhtes Coeruloplasmin haben (Tab. 3). Bei einem Coeruloplasmin-Spiegel über 40 mg/100 ml ist Serumkupfer signifikant erhöht.

Tab. 3
Beziehung des Coeruloplasmins zu den Eiweißhexosen und zum Serumkupfer

Eiweißhexosen [mg/100 ml]	Coeruloplasmin [mg/100 ml]	n	Signifikanz p:
A 100–130	$28,9 \pm 5,1$	13	A–B nicht signif.
B 131–140	$32,4 \pm 6,9$	8	A–C $< 0,001$
C 141–	$40,6 \pm 4,7$	10	B–C $< 0,02$
Coeruloplasmin [mg/100 ml]	Kupfer [μg/100 ml]		
< 40	$101,7 \pm 15,5$	13	
≥ 40	$121 \pm 7,5$	7	$\sim 0,01$

Einfluß der Körperarbeit

Nach langdauerndem Laufen wurde keine signifikante Veränderung des Serum-Coeruloplasmins beobachtet. Die mäßige Erhöhung — im Mittel 6,7% —, die nach Ergometerarbeit eintrat (Tab. 4), dürfte Folge einer 6,2proz. Steigerung der Gesamteiweiße nach der Anstrengung sein und somit keine physiologische Bedeutung haben.

Tab. 4
Änderungen der Serum-Coeruloplasminkonzentration nach Belastung. Die Werte sind in mg/100 ml angegeben

Sportler	Leistung: 1 Std. Laufen (RID-Verfahren)		1 Std. Ergometer (Enzymkinet. Verfahren)	
	vor	nach	vor	nach
W	26,2	28,3	25,0	26,7
M	34,8	33,9	28,6	28,6
R	26,8	28,3	21,9	22,3
T	27,6	28,5	20,2	19,7
Q	41,2*	36,5	33,7*	34,0
Rl	36,5*	38,5	28,9	34,1
K	—	—	22,9	25,6
E	—	—	22,8	26,5
$\bar{x} \pm s$	$32,2 \pm 6,2$	$32,3 \pm 4,6$	$25,5 \pm 4,5$	$27,2 \pm 5,2$

* Serum Glykoproteide als Hexosen > 140 mg/100 ml.

Ein gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant erhöhter Wert ($p < 0,001$) wurde bei den Radrennfahrern gefunden. Mittelwerte dieser nach mehreren Tagen Anstrengung untersuchten Gruppe liegen bei $37,6 \pm 5,5$ (enzymkinetisch) und $37,2 \pm 5,8$ mg/ml (RID-Verfahren).

Serumkupfer beträgt bei dieser Gruppe im Mittel $108 \pm 16,4$ μ g/100 ml.

Diskussion

Zur Methodik

Die in der Literatur erwähnte Übereinstimmung der enzymkinetischen und der verschiedenen Varianten der immunologischen Methode (8–10), wurde in dieser Arbeit erneut bestätigt. Eine besonders gute Korrelation wird erzielt, wenn man für die enzymkinetische Methode frisches Serum gebraucht. Wegen dieser Übereinstimmung, sowie dem kleinen Serumverbrauch und ihrer guten Reproduzierbarkeit sind diese beiden Methoden besonders zu empfehlen.

Es besteht ebenfalls eine gute Korrelation zwischen der Farbe des Coeruloplasmins und seiner Enzymaktivität (Tab. 2); jedoch die mit dem RID-Verfahren ermittelten Werten liegen um 40% höher (Abb. 3). Die Bestim-

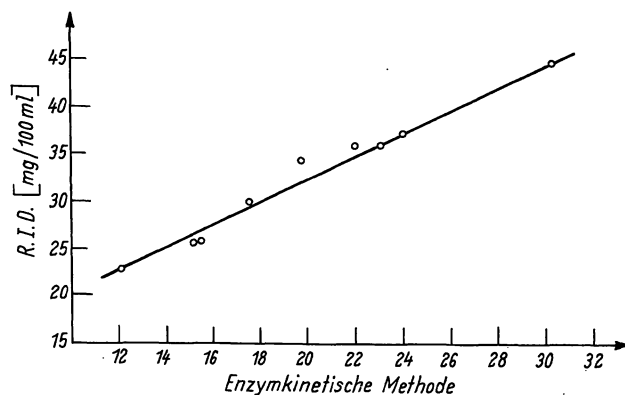


Abb. 3

Vergleich der enzymkinetisch und immunologisch ermittelten Coeruloplasminwerte im dialysiertem Serum (s. Text)

mungen wurden nach Deutsch (7) im dialysierten Serum durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß unter verschiedenen Bedingungen Dialyse gegen eine schwachsaure Lösung (z. B. pH 5,2) zu einem Farb- und Enzymaktivitätsverlust des Coeruloplasmins führen kann (11, 12). Bei 18stdg. Aufbewahrung (Raumtemperatur) ist es nicht ausgeschlossen, daß ein Teil des Proteins zu ungefärbten, inaktiven Körpern abgebaut wird, seine immunologischen Eigenschaften aber erhalten bleiben.

Der von Deutsch (7) angenommene $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ -Wert bei 610 nm scheint durch die Ergebnisse der Tabelle 2 weiter bestätigt zu sein. Obwohl wegen der oben diskutierten Tatsachen — hoher Serumverbrauch und geringere Reproduzierbarkeit — die chromatographisch-spektrophotometrische Methode für Serienuntersuchungen wenig geeignet ist, dürfte sie wertvoll

für die Eichung verschiedener Varianten der enzymkinetischen Methode bleiben.

Die Wahl des Eichstandards kann einen bedeutenden Einfluß auf die Ergebnisse haben, wenn man z. B. Standardseren gebraucht, die bei ihrer Herstellung zum Teil ihre Oxydaseaktivität, bzw. Coeruloplasminfarbe verlieren können, obwohl die immunologischen Eigenschaften praktisch unverändert bleiben. Die in dieser Arbeit geprüften Seren (Human Standardserum⁶⁾ und Seronorm⁷⁾) ergaben mit der enzymkinetischen Methode kleinere Werte als die angegebenen.

Zum Normalwert

Coeruloplasmin-Werte im Serum liegen nach den meisten Veröffentlichungen zwischen 25 und 35 mg/100 ml (Tab. 5). Als mögliche Ursachen für stark ab-

Tab. 5
Normalwerte des Serum-Coeruloplasmins beim Menschen (in mg/100 ml)

Autoren	$\bar{x} \pm s$	Methode
MARKOWITZ u. Mitarb. (9)	34 ± 4	Immunologisch
GELL (20)	35	Immunologisch
HITZIG (8)	$31,7 \pm 6,7$	Immunologisch
AUGENER (5)	$63 \pm 9,5$	Immunologisch
SCHUMACHER u. KESSLER (25)	$26,6 \pm 5,08$	Immunologisch
BECKER u. Mitarb. (26)	30 ± 5	Immunologisch
HARALAMBIE	$27,5 \pm 5$	Immunologisch
SCHULTZE u. SCHWICK (13)	30 (10–40)	Photometrisch
GOODMAN u. VULPE (21)	29	Photometrisch
DEUTSCH (7)	24 (17–36)	Chromatogr.-Spektrophotometrisch
WALSHE (22)	$32 \pm 1,1$	Enzymkinetisch
POULIK u. BEARN (10)	35	Enzymkinetisch
STEINLIEB u. JANOWITZ (23)	(20–35)	Enzymkinetisch
WEISS (14)	38 ± 8	Enzymkinetisch
COHNEN u. Mitarb. (24)	42 ± 9	Enzymkinetisch

weichende Werte dürfte u. a. bisher folgendes zu beachten sein:

— Verschiedene, nicht nur pathologische Zustände beeinflussen den Coeruloplasmin-Spiegel; so nimmt z. B. das Protein mit dem Alter zu (13); erhöhte Werte wurden bei Kindern gefunden (14).

— Bei Frauen wurde über einen leicht erhöhten Wert gegenüber Männern berichtet (7). Eine Zunahme des Coeruloplasmins wurde während der Regelblutung beobachtet (15). Neuerdings hat man eine Erhöhung des Serum-Kupferspiegels bei Frauen, die Ovulationshemmer nehmen, beschrieben (16), was nicht ohne Einfluß auf den Coeruloplasmin-Spiegel sein dürfte.

Einfluß der Körperanstrengung

Übereinstimmend mit VITELLIO und MAYO (17) fanden wir keinen gesicherten sofortigen Einfluß von Körperarbeit auf den Coeruloplasminspiegel; vielmehr dürfte eine Spätveränderung des Glykoproteins angenommen werden. Es zeigte sich, daß erhöhte Glykoproteid-Hexosewerte infolge mehrerer Arbeitstage von einer Erhöhung des Coeruloplasmins begleitet werden. Somit

⁶⁾ Partigen, Behringwerke.

⁷⁾ Nyegaard & Co., Oslo, Norway.

sollte das Coeruloplasmin in der allgemeinen Steigerung der Glykoproteide nach mehrtägiger Körperanstrengung mitbeteiligt sein.

Die renale Ausscheidung des Coeruloplasmins ist nach langdauernder Körperarbeit erhöht (18); die absoluten Werte überschreiten jedoch nicht 0,15 mg/Std. (19), was keine Folge auf den Serumspiegel haben kann. Die physiologische Bedeutung dieser Spätschwankungen des Coeruloplasmins ist nicht geklärt. Man darf jedoch

an Stoffwechselprozesse in der Erholung denken, in denen Enzyme und Proteine des Serums mitverändert werden. Demnach muß bei der Bewertung der Normalwerte neben den oben angeführten Einschränkungen auch der nicht unwesentliche Einfluß von langwährenden Belastungsphasen an vorausgegangenen Tagen berücksichtigt werden.

Herrn Doz. Dr. J. KEUL dankt der Autor für seine freundliche Unterstützung.

Literatur

1. HARALAMBIE, G., *Acta biol. med. german.*, 13, 30 (1964). —
2. HARALAMBIE, G. und G. JEFLEA, *Int. Z. angew. Physiol.* 20, 515 (1965). — 3. HARALAMBIE, G. und I. MURESANU, *Méd. Educ. Phys. Sport* 41, 141 (1967). — 4. HOUGHIN, O., *Clin. Chem. New York* 4, 519 (1958). — 5. AUGENER, W., *Proc. 12th Coll. Protides in biol. fluids*, Brugge, 1964, S. 363 (1965). — 6. MANCINI, G., A. CARONARA und J. HEREMANS, *Immunochem.* 2, 235 (1965). —
7. DEUTSCH, H., *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 5, 460 (1960). —
8. HITZIG, W., *Internat. Arch. Allergy* 19, 284 (1961). — 9. MARKOWITZ, H., C. GUBLER, J. MAHONEY, G. CARTWRIGHT und M. WINTROBE, *J. Clin. Invest.* 36, 1498 (1955). — 10. POULIK, M. und A. BEARN, *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 7, 374 (1962). —
11. DEUTSCH, H., *Arch. Biochem. Biophysics* 89, 225 (1960). —
12. MARRIOTT, J. und D. PERKINS, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 117, 387 (1966). — 13. SCHULTZE, H. und G. SCHWICK, *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 4, 15 (1959). — 14. WEISS, W., *Klin. Wschr.* 43, 273 (1965). — 15. GONZALES, A. und I. RERAL, *Acta gynaecol. obstetr. Hisp.-Lusit.*, 13, 297 (1964). — 16. STRICK, W. und H. HAUG, *Klin. Wschr.* 46, 957 (1968). — 17. VITELLIO, E. und C. MAJO, XVI. Weltkongr. Sportmed., "S"-Beiträge Teil II, No. 232, Hannover, 1966. — 18. POORTMANS, J., E. van KERCHOVE und J.-J. s' JONGERS, *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 8, 631 (1963). — 19. POORTMANS, J. und R. JEANLOZ, *J. Clin. Invest.* 47, 386 (1968). — 20. GELL, P., *J. Clin. Path. London* 10, 67 (1957). — 21. GOODMAN, M. und M. VULPE, *World Neurol.* 2, 589 (1961). — 22. WALSHE, J., *J. Clin. Invest.* 42, 1048 (1963). — 23. STEINLIEB, I. und H. JANOWITZ, *J. Clin. Invest.* 43, 1049 (1964). — 24. COHNEN, G., M. WERNER und O. ARNOLD, *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 73, 817 (1967). — 25. SCHUMACHER, K. und M. KESSLER, *diese Z.* 6, 26 (1968). — 26. BECKER, W., W. RAPP, H. G. SCHWICK und K. STÖRIKO, *diese Z.* 6, 113 (1968).

Dr. G. Haralambie
78 Freiburg i. Br.
Hugstetter Str. 55